

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-264870

(43) 公開日 平成9年(1997)10月7日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	27/327		G 0 1 N 27/30	3 5 3 Z
	21/78		21/78	C
			27/30	3 5 3 P

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平8-97361

(22) 出願日 平成8年(1996)3月28日

(71) 出願人 000001443

カシオ計算機株式会社
東京都新宿区西新宿2丁目6番1号

(72) 発明者 当山 忠久

東京都八王子市石川町2951番地の5 カシオ計算機株式会社八王子研究所内

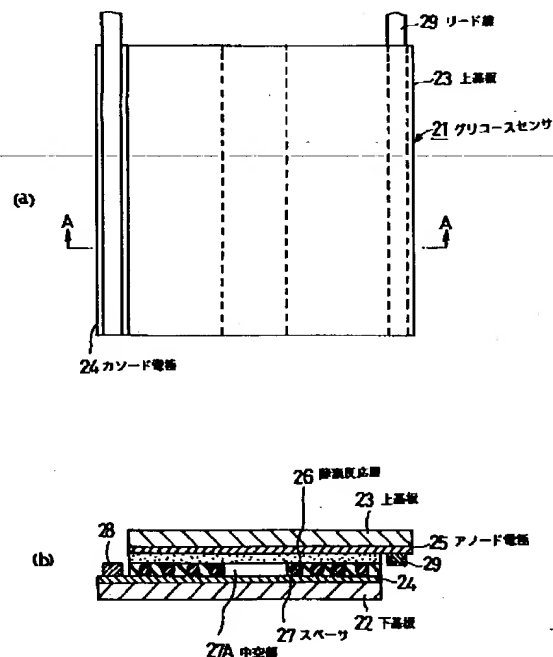
(74) 代理人 弁理士 杉村 次郎

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【課題】 妨害電流の影響を防止し、微量の試料液で基質の測定が可能なバイオセンサを提供する。

【解決手段】 下基板22上面全域にカソード電極24を形成し、間隔の狭い2本のスペーサ27を介してカソード電極24上に、中空部27Aを覆うように酵素反応層26およびアノード電極25が順次形成され、アノード電極25上に上基板23が設けられている。酵素反応層26はグルコースオキシダーゼとロジウム含有カーボンペーストとを混合したもので形成されている。このため、アスコルビン酸などの妨害物質による妨害電流の影響を受けることなくグルコース濃度の測定を行える。また、スペーサ27どうしの間が狭いため、導入する試料液の量が少なくてよい。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 相対向する一对の基板のうち、一方の前記基板の対向内側面の全域にカソード電極を形成し、他方の前記基板の対向内側面の全域にアノード電極を形成し、前記アノード電極の対向内側面の全域に、酵素とロジウム含有カーボンとを含んでなる酵素反応層を形成し、基板間に試料液を導入する細径の試料液導入空間を形成するスペーサが介在されていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 前記スペーサは、スクリーン印刷法により形成されていることを特徴とする請求項1記載のバイオセンサ。

【請求項3】 前記酵素反応層は、スピンコーティング法により形成されていることを特徴とする請求項1または請求項2に記載のバイオセンサ。

【請求項4】 酵素と該酵素の酵素反応に伴って発光する発光材料とを含む酵素反応層が形成された該発光の波長域の光に対し実質的に遮光性を有する第1基板と、該第1基板と所定の間隔離間して配置され、前記発光材料の発光を受光する受光素子が設けられた第2基板と、を備えることを特徴とするバイオセンサ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、バイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】従来、バイオセンサとしては、図7(a)、(b)に示すような構造のものが提案されている。このバイオセンサでは、図示するように、1枚の絶縁基板1上に、対極としてのカソード電極2が形成されている。また、カソード電極2の両側方には、このカソード電極2を挟むように、作用極としてのアノード電極3と補正用アノード電極4とが形成されている。アノード電極3の先端部には、例えばグルコース酸化酵素であるグルコースオキシダーゼ(以下、GODという)が固定化された酵素反応層5が形成されている。そして、カソード電極2は、リード線6を介して電圧印加回路7および電流測定回路8に接続されている。また、アノード電極3は、リード線9を介して電圧印加回路7および電流測定回路8に接続されている。さらに、補正用アノード電極4は、リード線10を介して電圧印加回路7および電流測定回路8に接続されている。さらにまた、電流測定回路8は、演算手段11および表示手段12に接続されている。

【0003】このような構成の従来のバイオセンサでは、酵素が固定化されていない補正用アノード電極4を備えているため、アノード電極3と補正用アノード電極4との電流応答の差をとることにより、試料液中に含まれる還元性物質、例えばアスコルビン酸や尿酸などの電解酸化電流を差し引き、酵素反応によって生じる過酸化

水素または還元型メディエータの酸化電流のみを検出することができる。このため、妨害物質による電流を除去でき、グルコース濃度に相関のある電流のみを得ることができ、試料液中のグルコース濃度を高精度に測定できる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】このようなバイオセンサでは、妨害物質による電流を除去するため、カソード電極2に対してアノード電極3と補正用アノード電極4とを備える構造となっている。測定に際しては、各電極の先端を覆うだけの量の試料液を滴下する必要がある。ところが、各電極は面方向に離れて形成されているため、必要とする試料液の量が多くなるという問題点がある。また、このように各電極が面方向に離れて形成されるため、バイオセンサの小型化を図りにくいものであった。さらに、このように各電極を配置・形成し、さらにアノード電極3の先端部分のみに酵素反応層5を形成するため、容易に製造できないという問題点があった。

【0005】そこで、この発明が解決しようとする課題は、所謂妨害物質を含んだ試料液中の基質濃度の測定を高精度に行うことができ、測定に必要な試料液の量が少なく、しかも製造が容易なバイオセンサを得るにはどのような手段を講じればよいかという点にある。

【0006】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の発明は、相対向する一对の基板のうち、一方の前記基板の対向内側面の全域にカソード電極を形成し、他方の前記基板の対向内側面の全域にアノード電極を形成し、前記アノード電極の対向内側面の全域に、酵素とロジウム含有カーボンとを含んでなる酵素反応層を形成し、前記基板間に、前記カソード電極と前記酵素反応層とが対向して臨む、試料液を導入する細径の試料液導入空間を、形成するスペーサが介在されていることを特徴としている。

【0007】請求項1記載の発明においては、滴下された試料液が、細径の試料液導入空間内に毛细管現象により速やかに導入される。試料液導入空間内では、カソード電極と酵素反応層とが対向しているため、試料液はカソード電極と酵素反応層との両方に接触する。そして、酵素反応層では、試料液中の基質と酵素とが反応してアノード電極カソード電極との間に流れる電流値を変化させる。この電流値の変化に対応して基質濃度を確定することが可能となる。

【0008】請求項2記載の発明は、前記スペーサが、スクリーン印刷法により形成されていることを特徴としている。また、請求項3記載の発明は、前記酵素反応層が、スピンコーティング法により形成されていることを特徴としている。

【0009】請求項4記載の発明は、バイオセンサにおいて、酵素と該酵素の酵素反応に伴って発光する発光材料とを含む酵素反応層が形成された該発光の波長域の光

に対し実質的に遮光性を有する第1基板と、該第1基板と所定の間隔離間して配置され、前記発光材料の発光を受光する受光素子が設けられた第2基板と、を備えることを特徴としている。

【0010】請求項4記載の発明においては、第1基板と第2基板との間に、第1基板に設けられた酵素反応層で酵素反応を引き起こさせる試料が導入しやすいように所定の間隔離間して配置され、酵素反応層側の第1基板と異なる第2基板側に受光素子を設けているので、酵素反応層の酵素反応に伴う発光を最も受光しやすい最適位置に受光素子を配置することができる。このため、少量の試料内の測定対象物の濃度を受光量から測定することができる。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、この発明に係るバイオセンサの詳細を図面に示す実施形態に基づいて説明する。

【0012】(実施形態1) 図1～図3は、この発明に係るバイオセンサの実施形態1を示している。この実施形態のバイオセンサは、グルコースセンサに本発明を適用したものである。図1(a)はバイオセンサの平面図、図1(b)は図1(a)のA-A断面図である。図中21はグルコースセンサを示している。このグルコースセンサ21は、相対向する一対の下基板22、上基板23と、下基板22の対向内側面に形成された対極としてのカソード電極24と、上基板23の対向内側面(下面)に形成された作用極としてのアノード電極25と、このアノード電極25の下面に形成された酵素反応層26と、酵素反応層26とカソード電極24との間に配置されたスペーサ27と、カソード電極24に接続されたリード線28と、アノード電極25に接続されたリード線29と、から大略構成されている。

【0013】まず、図2(a)および(b)を用いて下基板22側の構造を詳しく説明する。なお、図2(a)は下基板22にカソード電極24、スペーサ27およびリード線28を形成した構造体の平面図であり、図2(b)は図2(a)のB-B断面図である。下基板22は、絶縁性材料で形成された矩形状の板である。カソード電極24は、例えば白金(Pt)でなり、下基板22の表面にスクリーン印刷法、スパッタリング法、無電解メッキ法などの方法を用いて、基板全面に互って形成されている。このカソード電極24の幅方向の一方の側縁部上には、長さ方向に沿ってリード線28が接続するように設けられている。また、カソード電極24上の他の領域には、幅方向の中央に長さ方向に沿って形成される中空部(溝部)27Aを除く領域に所定の厚みをもつスペーサ27が、例えばスクリーン印刷法で形成されている。なお、このスペーサ27は、接着剤に、所定の外径寸法のビーズ状の粒体27Bが混合されてなり、電気絶縁性をもつ。

【0014】次に、図3(a)および(b)を用いて上

基板23側の構造を詳しく説明する。なお、図3(a)は、上基板23にアノード電極25、酵素反応層26およびリード線29を形成した構造体の平面図であり、図3(b)は図3(a)のC-C断面図である。上基板23は、上記した下基板22と同様に絶縁性材料で矩形状に形成され、その大きさ(面積)も下基板22と同様である。この上基板23の下面に形成されたアノード電極25は、例えば白金(Pt)でなり、上基板23の表面にスクリーン印刷法、スパッタリング法、無電解メッキ法などの方法を用いて、基板全面に互って形成されている。また、アノード電極25の幅方向の一方の(上下基板22、23とを張り合わせた際に下基板22に接続したリード線28に対して反対)側縁部の下面には、長さ方向に沿ってリード線29が接続するように設けられている。また、アノード電極25の下面の他の領域には、酵素反応層26が形成されている。この酵素反応層26は、ロジウム含有カーボンペーストと、グルコース酸化酵素であるグルコースオキシダーゼ(GOD)との混合溶液をスピンコーティング法により塗布されてなる。なお、リード線29は、酵素反応層26を部分的に除去した後アノード電極25に接続してもよいし、または酵素反応層26を形成する前にリード線29を形成してもよい。

【0015】本実施形態のグルコースセンサ21は、図1(a)および(b)に示したように、上記した下基板22側と上基板23側とを張り合わせることで構成される。なお、下基板22側と上基板23側とは、対向する基板に対して各リード線28、29が重ならないように、互いにリード線の幅寸法程度ずらして張り合わされている。この張り合わせは、スペーサ27を構成する接着剤により行われている。なお、このグルコースセンサ21には、リード線28、29を介して図示しない電圧印加回路、電流測定回路、演算手段および表示手段などが接続されている。

【0016】図4に示すグラフは、本実施形態のグルコースセンサ21を用いて、グルコース濃度が既知のグルコース溶液を所定量ずつ滴下して、そのときアノード電極25とカソード電極24との間に流れた電流値を順次測定し、これから電流減少量を求め、その値をプロットした検量線を描いたものである。なお、このときのアノード電極25とカソード電極24との間に印加した電圧は0.7Vである。

【0017】このようにして検量線を作成した後、この検量線を作成したときと同じ条件のもとで、新たにグルコース濃度が未知の試料液をグルコースセンサ21に極微量(200 μ l)滴下した。そして、このときの電流値減少量を求めたところ、電流減少量は50nAであった。この電流減少量を図4の検量線にあてはめ、これから試料液のグルコース濃度が約40mg/dlであることが求められた。したがって、この試料液のグルコース

濃度から、計算により試料液のグルコース濃度が約1g/dlであることが確定できた。なお、図4の検量線を示すグラフより、グルコース濃度が上昇するに伴って電流減少量が増加することがわかる。したがって、この検量線を用いれば、血液や尿などのグルコースを含む試料液中の、グルコース濃度を測定することが可能となる。なお、試料液にアスコルビン酸などの妨害物質が含まれている場合、妨害物質の影響を受けることなくグルコース濃度の測定が可能となった。

【0018】次に、上記した構成のグルコースセンサ21の操作方法およびグルコースセンサ21の作用・動作を以下に説明する。まず、中空部分27Aの両端のどちらか一方に試料液を滴下すると、試料液は毛細管現象により、中空部27Aに沿ってセンサ内部へ取り込まれて酵素反応層26へ拡散していく。すると、酵素反応層26では酵素反応が起こり、試料液中のグルコースが酸化されると同時に、過酸化水素が生成する。次に、試料液が対向する電極間に十分入り込むのを待って、所定時間経過後、カソード電極（対極）24を基準としてアノード電極（作用極）25に例えば0.2V程度の負の電圧を印加しない電圧印加回路によって印加する。この電圧印加により、対向したアノード電極25、カソード電極間に過酸化水素の電解還元電流が流れる。電圧印加してから例えば5秒後の電解電流を電流測定回路により測定する。この電流値は酵素反応によって生成する過酸化水素量と相関があり、過酸化水素生成量はグルコース濃度に比例するため、電流値からグルコース濃度を求めることができる。このとき、酵素反応層26は、ロジウム含有カーボンペーストにGODを混合してなるアノード電極25側に負の電圧を印加しているため、過酸化水素の還元電流は観察されるが、例えばアスコルビン酸、尿酸、アセトアミノフェンなどの容易に酸化されやすい物質に起因する電流はほとんど流れない。すなわち、本実施形態のグルコースセンサ21では、妨害電流の発生が防止できるため、正確なグルコース濃度を測定することができる。

【0019】本実施形態では、以下に説明するような効果がある。すなわち、本実施形態では、上記したように酵素反応層26として、GODを混合したロジウム含有カーボンペーストが用いられているため、妨害物質の電流を検出することなく、グルコースに起因する電流のみを検出するので、不純物の補正用の新たな電極を別途設ける必要がない。このため、グルコースセンサ21の構成が簡略化できる。具体的には、下基板22や上基板23に形成されるカソード電極24やアノード電極25はそれぞれの基板の表面全域に互って形成するだけでよい。そのため、形状加工が非常に簡単になる。また、酵素反応層26もアノード電極25の略表面全域に形成すればよい。そのため、スピンコーティング法などの方法を採用することで膜厚制御性を向上できる。さらに、スペーサ27も、

スクリーン印刷法などの手間のかからない方法で形成でき、加えて液晶セルの製造技術を適用できるという利点もある。また、本実施形態では、スペーサ24どうしの間隔を短くすることにより、導入する試料液の量を微量化することができる。

【0020】以上、実施形態1について説明したが、本発明はこれに限定されるものではなく、構成の要旨に付随する各種の設計変更が可能である。例えば、上記実施形態では、酵素反応層26を、GODをロジウム含有カーボンペーストに混合したものをを用いてグルコース濃度を測定するためのグルコースセンサとしたが、固定化する酵素を適宜選択することにより、各種成分濃度を測定するためのバイオセンサとすることができる。また、上記実施形態では下基板22と上基板22を幅方向にリード線の幅寸法程度ずらした構成としたが、両基板を長さ方向にずらして試料液を中空部27Aへ導入するための試料液滴下部を備えた構成としてもよい。さらに、上記実施形態では、スペーサ27中にビーズ状の粒体27Bを混合した構成としたが、接着剤の粘度等を調整することによりスペース設定が容易になるため、粒体27Bを混入させない構成としてもよい。

【0021】（実施形態2）以下、本発明の実施形態2を図5（a）、（b）、（c）を用いて説明する。図5（a）は本実施形態のグルコースセンサ21の平面図、図5（b）は図5（a）のD-D断面図、図5（c）は図5（a）のE-E断面図である。なお、この実施形態2は上記した実施形態1の変形例であるため、実施形態1と同一部分には同一の符号を付してその説明を省略する。

【0022】本実施形態のグルコースセンサ21の特徴は、上基板23の幅寸法を下基板22の幅寸法と略同一とし、上基板23の長さ寸法を下基板22の長さ寸法より短く設定している点である。そして、本実施形態は、上基板23側と下基板22側とを組み合わせたときに、下基板22側のカソード電極24が露出して、試料液を中空部27Aの導入口付近に滴下し易くした構成としている。

【0023】本実施形態の具体的な構成を以下に説明する。まず、矩形形状の下基板22の表面全域には、カソード電極24が形成されている。カソード電極24表面の一方の側縁部（図中右側）には、リード線28が接続するように形成されている。このリード線28の端縁は、カソード電極24の長さ方向の中間部に位置するように配置されている。そして、カソード電極24上におけるリード線28の側方には、所定の膜厚に設定された矩形形状の2つのスペーサ27が、他方の側縁部（図中左側）に向けて、所定間隔を介して形成されている。これらスペーサ27、27の間の部分は、下基板22側と上基板23側とが組み合わされた状態で中空部27Aとなる。なお、スペーサ27は、本実施形態ではスクリーン

印刷法を用いて形成している。また、本実施形態では、スペーサ27を粘性の高い接着剤のみで形成している。これらスペーサ27の上には、上基板23側が架設されている。上基板23側の構造としては、上基板23の下面に、アノード電極25が全域に形成されている。また、アノード電極25下面の他方の側縁部にはリード線29が長さ方向に沿って接続・形成されている。さらに、アノード電極25下面における、リード線29を形成した領域およびその付近を除く領域に、全域に互って酵素反応層26が形成されている。本実施形態においても、酵素反応層26は、GODを混合したロジウム含有カーボンペーストで形成されている。そして、この酵素反応層26が上記したスペーサ27の上面に張り合わされている。なお、図4に示すように、それぞれのリード線28、29は、他方側の基板と平面的に重なり合わないよう、下基板22側と上基板23側とを互いに幅方向にずらした構造となっている。

【0024】本実施形態のグルコースセンサにおける作用を以下に説明する。すなわち、本実施形態では中空部27Aの入口近傍に位置するカソード電極24上に試料液を滴下させると、試料液は毛細管現象を起こして中空部27A内に導入される。そして、試料液は酵素反応層26を浸透してアノード電極25に到達し、試料液がカソード電極24とアノード電極25との間に介在される。酵素反応層26では、試料液中のグルコースが酸化されると同時に過酸化水素を生成する。この状態で、上記実施形態1と同様の電流測定を行うことによりグルコース濃度を求めることができる。本実施形態においても、酵素反応層26として、GODを混合したロジウム含有カーボンペーストが用いられているため、妨害物質の電流を検出することなく、グルコースに起因する電流のみを検出するので、補正用の新たな電極を別途設ける必要がない。このため、グルコースセンサ21の構成を簡略化できる。

【0025】(実施形態3)以下、本発明の実施形態3を図6(a)、(b)、(c)を用いて説明する。図6(a)は本実施形態のグルコースセンサの平面図、(b)は図6(a)のF-F断面図、(c)は図6(a)のG-G断面図である。本実施形態のグルコースセンサの特徴は、酵素反応による生成物質と発光試薬との反応により発生する光の量を検出することにより、試料液中の基質(グルコース)濃度を測定することである。同図中31は、グルコースセンサを示している。このグルコースセンサ31は、対向する不透明基板32と透明基板33との間に2本のスペーサ34が介在され、不透明基板の上面略中央に酵素反応層35が形成され、透明基板33の上面中央に酵素反応層35と対向する受光素子36が配置され、さらに受光素子および透明基板33を覆うように遮光膜37が形成されて、大略構成されている。

【0026】具体的に説明すると、不透明基板32は、試料液により影響を受けない、不透明材料で矩形状に形成されている。酵素反応層35は、不透明基板32上面の略中央に円板状に形成されている。また、この酵素反応層35は、例えばルミノールとGODの複合酵素系を固定化してなる。ルミノールとしては、5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオンまたは3-アミノフタル酸ヒドラジドがある。なお、この酵素反応層35はスクリーン印刷法などにより形成することができる。スペーサ34、34は、酵素反応層35を挟むように、不透明基板32上面における幅方向の両側に所定距離を隔てて、それぞれ不透明基板32の長さ方向に沿って形成されている。なお、スペーサ34の先端部(センサ先端側)は不透明基板32の先端縁より少し後方(図中右方)に位置するように設定されている。このため、不透明基板32の先端縁側部分は、透明基板33に覆われず、この前庭状の部分が試料液導入部32Aとなる。また、これらスペーサ34どうしの間は試料液が導入される導入空間38となる。すなわち、これらスペーサ34、34の上には、例えばガラスでなる透明基板33が配置されて、不透明基板32、透明基板33およびスペーサ34、34で囲まれた試料液導入空間38が形成される。さらに、透明基板33上面の略中央には、酵素反応層35と対向するように受光素子36が配置・固定されている。図中36Aは、受光素子36の配線を示しており、図示しない電流検出手段に接続されている。そして、この受光素子36および透明基板33の表面を覆うように、例えば樹脂でなる酵素反応層35の発光を遮光する遮光膜37が形成されている。

【0027】以下に、本実施形態のグルコースセンサ31の操作方法ならびに作用・動作を説明する。まず、グルコースセンサ31の試料液導入部32A上に、基質(グルコース)を含む試料液を滴下する。滴下された試料液は、毛細管現象により試料液導入空間38に導入され酵素反応層35に速やかに到達する。酵素反応層35は、ルミノールとGODの複合酵素系を固定化したものであるため、GODによりグルコースが酵素反応を経て生成された過酸化水素がルミノールを酸化することにより、生成された過酸化水素量に応じた光量の光を発する作用をもつ。この光は、透明基板33を通過して受光素子36で検出される。この受光素子36の光検出量に応じて、試料液中のグルコース濃度を確定することができる。なお、本実施形態では、スペーサ34どうしの間隔を狭くすることにより、導入する試料液の量を少なくすることができ、しかも毛細管現象を促進して速やかに試料液を導入することが可能となる。

【0028】本実施形態については、酵素反応層35を不透明基板32と透明基板33との間で試料液を導入する構成であり、不透明基板32と遮光膜37とが、酵素反応層35および受光素子36とを外部からの光から実

質的に遮光するので、受光素子が外部の光を受光することがなく酵素反応に伴う発光の光量に応じたグルコース濃度を精度良く測定することができる。

【0029】以上、本実施形態について説明したが、本発明はこれに限定されるものではなく、構成の要旨に付随する各種の変更が可能である。例えば本実施形態では、ルミノールを用いたが、他の化学発光を示す物質を用いても勿論よい。また、本実施形態では、基質としてグルコース濃度を測定するバイオセンサとしたが、酵素反応により過酸化水素を生成する基質であれば、他の基質濃度を測定するバイオセンサとしてもよい。

【0030】本実施形態では、透明基板33側に遮光膜を設けたが、透明基板33の代わりに受光素子36が検知可能な波長域の光に対し遮光性を有する基板を適用し、この基板の酵素反応層35側に受光素子36を設けてもよい。

【0031】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、この発明によれば、アスコルビン酸などの妨害電流を発生させる物質を含んだ試料液中の基質濃度の測定を高精度に行うことができる。また、測定に必要な試料液の量が少なく、しかも製造が容易なバイオセンサを実現する効果がある。また、この発明によれば、電極の数を削減し、また電極構造を簡単にすることができるため、製造コストを削減できるという効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】(a)は本発明の実施形態1の平面図、(b)は(a)のA-A断面図。

【図2】(a)は本発明の実施形態1の平面図、(b)

は(a)のB-B断面図。

【図3】(a)は本発明の実施形態1の平面図、(b)は(a)のC-C断面図。

【図4】実施形態1のグルコースセンサを用いて作成したグルコース濃度と電流減少量との関係を示すグラフ。

【図5】(a)は本発明の実施形態2の平面図、(b)は(a)のD-D断面図、(c)は(a)のE-E断面図。

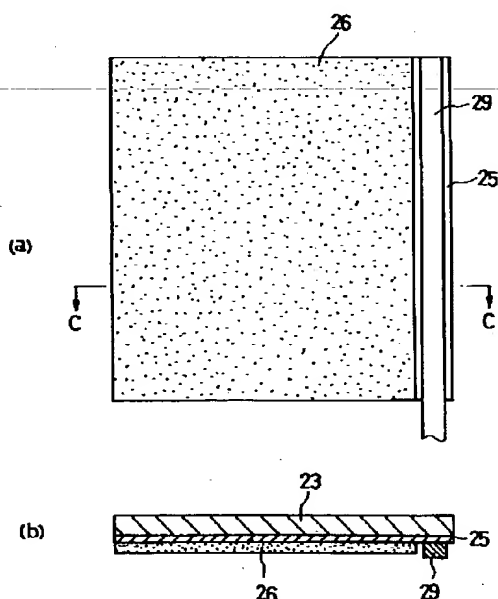
【図6】(a)は本発明の実施形態3の平面図、(b)は(a)のF-F断面図、(c)は(a)のG-G断面図。

【図7】(a)は従来のバイオセンサの平面図、(b)は(a)のX-X断面図。

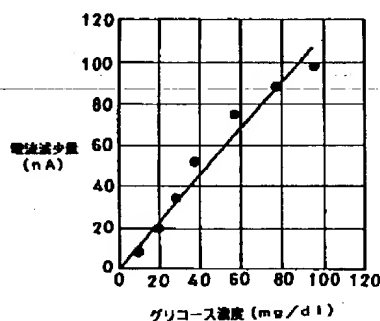
【符号の説明】

- 21 グルコースセンサ
- 22 下基板
- 23 上基板
- 24 カソード電極
- 25 アノード電極
- 26 酵素反応層
- 27 スペース
- 27A 中空部
- 31 グルコースセンサ
- 32 不透明基板
- 33 透明基板
- 34 スペース
- 35 酵素反応層
- 36 受光素子
- 37 遮光膜

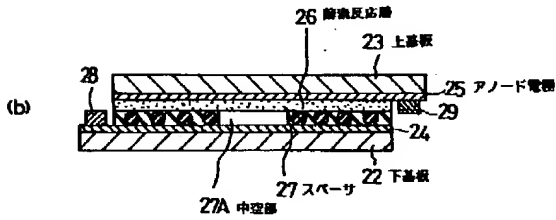
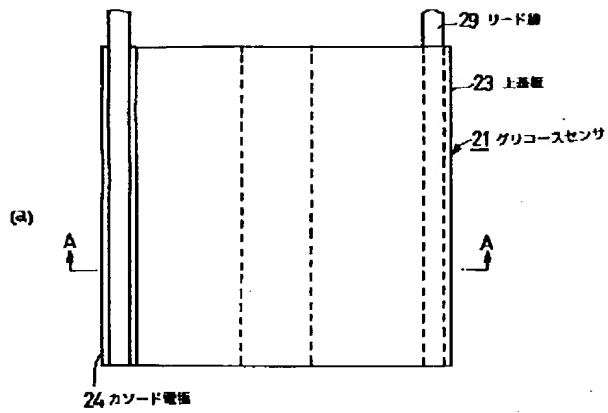
【図3】



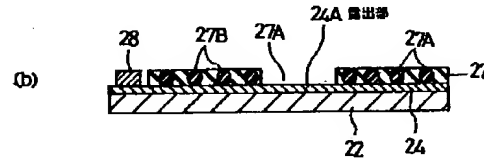
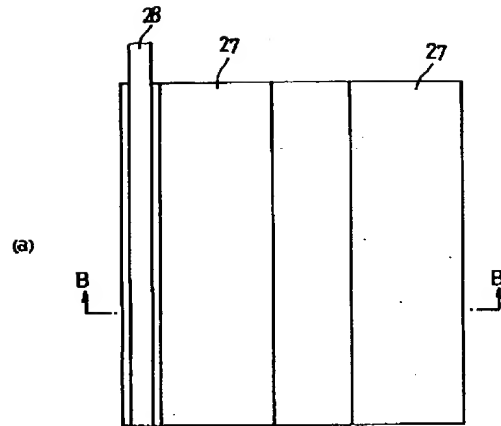
【図4】



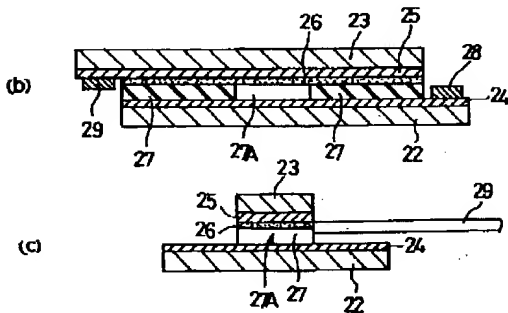
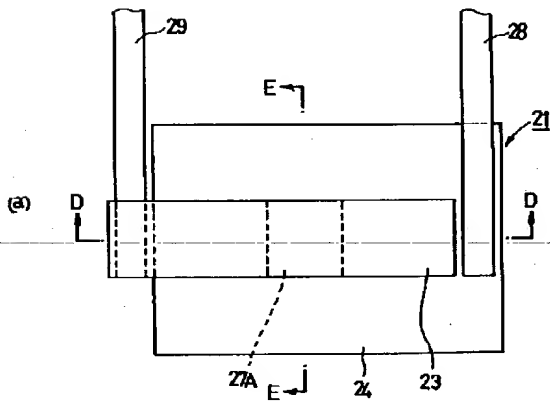
【図1】



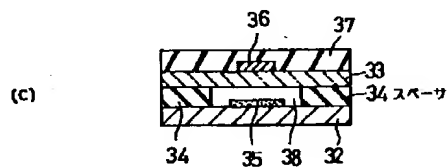
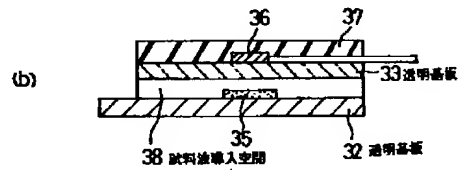
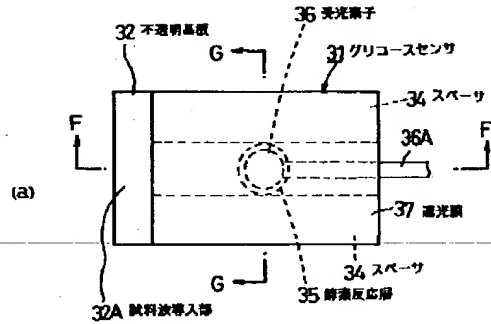
【図2】



【図5】



【図6】



【図7】

